

## Nowoczesne rozpoznawanie talasemii u dzieci — doświadczenia własne

### Modern diagnosis of thalassemia in children — own experience

Katarzyna Albrecht<sup>1</sup>, Anna Adamowicz-Salach<sup>1</sup>,  
Alicja Siwicka<sup>1</sup>, Beata Burzyńska<sup>2</sup>, Michał Matysiak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Zakład Biochemii i Biofizyki Państwowej Akademii Nauk, Zakład Genetyki

#### Streszczenie

**Wstęp:** Talasemie to grupa genetycznie uwarunkowanych niedokrwistości hemolitycznych, spowodowanych ilościowym zaburzeniem syntezy łańcuchów globiny, zaliczana do grupy hemoglobinopatii ilościowych. Niniejsza praca, jako jedna z niewielu w polskim piśmiennictwie, zwraca uwagę na problem występowania talasemii w populacji dzieci polskich.

Celem pracy była ocena poszczególnych parametrów hematologicznych w rozpoznaniu różnicowym niedokrwistości mikrocytowych u dzieci, określenie roli badań genetycznych w rozpoznawaniu talasemii u dzieci oraz opracowanie optymalnego algorytmu postępowania diagnostycznego przy podejrzeniu talasemii.

**Materiał i metody:** Badaniami objęto grupę 52 dzieci (31 chłopców i 21 dziewcząt) w wieku od 1–15 lat bezskutecznie leczonych preparatami żelaza z powodu niedokrwistości mikrocytowej. Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej WUM Nr 65/2007. Po analizie wywiadu i podstawowych badań hematologicznych u wszystkich chorych wykonano elektroforezę hemoglobin, oznaczenie poziomu HgbA2 i HgbF, w trzech przypadkach oznaczenie enzymów krwinek czerwonych, w dwóch badanie w kierunku sferocytozy wrodzonej. Ponadto u wszystkich pacjentów wykonano badania genetyczne w Zakładzie Genetyki PAN w Warszawie.

**Wyniki:** Spośród 52 dzieci objętych badaniem u 29 rozpoznano talasemię- $\beta$  minor. U 28 wystarczające okazały się rutynowe badania diagnostyczne oraz wykonanie elektroforezy hemoglobin i oznaczenia stężeń HgbA2 i HgbF. U jednego pacjenta rozpoznanie ustalono po badaniu genetycznym. U 6 dzieci dzięki badaniom genetycznym rozpoznano talasemię- $\alpha$  minor. U 17 dzieci pomimo badań genetycznych nie udało się ustalić rozpoznania. U 6 z nich badanie wykazało mutację promotora genu  $\gamma$  globiny (*Xmn1*) odpowiedzialną za podwyższenie stężenia HgbF. Badanie pozwoliło na stworzenie algorytmu postępowania diagnostycznego u chorych na niedokrwistość mikrocytową.

**Wnioski:** Z uwagi na dużą liczbę fałszywie dodatnich i ujemnych wyników, wskaźniki matematyczne nie wydają się mieć wielkiego znaczenia w diagnostyce mikrocytozy.

Erytrocytoza, mikrocytoza, obniżenie MCH przy prawidłowych parametrach gospodarki żelazem, krwinki tarczowate w rozmazie są wskazaniem do przeprowadzenia diagnostyki w kierunku talasemii- $\alpha$ , rzadszych postaci talasemii- $\beta$  lub ich współwystępowania.

*Rola badań genetycznych w diagnostyce talasemii  $\alpha$  jest nieoceniona, choć nie zawsze daje ostateczną odpowiedź.*

**Słowa kluczowe:** talasemia, dzieci, rozpoznawanie, diagnostyka molekularna

*J. Transf. Med. 2011; 3: 105–114*

## Summary

**Background:** *There has been a consensus that thalassemys are typical of the Mediterranean region, North Africa, and Far and Middle Asia. However, recent progress in diagnostic methods has led to the detection of thalassemia in Poland.*

*Routinely employed diagnostics often turn out insufficient to diagnose thalassemia, substantiating the need to use modern molecular biological techniques.*

*This paper aimed at assessing the utility of some so far infrequently employed molecular genetic tests for facilitating diagnosis of rare non-typical cases of thalassemia in Polish children. Against this background, the significance of hematological parameters in the differential diagnosis of microcytic anemias was evaluated. Based on the above, an attempt has been made to establish an optimal algorithm for diagnosis of suspected thalassemia.*

**Material and methods:** *The study comprised a group of 52 children (31 boys and 21 girls) at the age of 1–15 years, who were subjected to long-term treatment with iron preparation due to microcytic anemia, with no subsequent improvement. A permission of the local Bioethical Committee was obtained for this study.*

*After taking the history, basic hematologic tests were performed. The tests were then extended to electrophoretic separation of hemoglobins, determination of HgbA2 and HgbF. In three cases erythrocyte enzymes were tested, and in two examination towards hereditary spherocytosis was carried out. Finally, genetic tests were performed.*

**Results:** *Of the 52 children examined, 29 cases were diagnosed as  $\beta$ -thalassemia minor. Routine diagnostic tests (blood morphology, serum iron and ferritin, hemoglobin electrophoresis, HgbA2 and HgbF assay) were enough to ascertain diagnosis in 28 children. Diagnosis of 1 case was only possible on the basis of genetic tests.*

*Alpha-thalassemia minor was diagnosed in 6 children, and the diagnosis was only possible due to genetic tests.*

*No diagnosis was ascertained in 17 children. Within this group, in 6 children only mutation in the  $\gamma$  globin gene promoter region (Xmn1) was held responsible for increased HgbF.*

**Conclusions:** *Considering numerous false positive and false negative results, mathematical indexes as the initial screening in microcytic anemia seem not to have significant impact on differential diagnosis. Genetic tests play essential role in diagnosing thalassemia although they are not always effective. Changes such as erythrocytosis, microcytosis, hypochromy as well as the presence of shield erythrocytes in peripheral blood smears indicating to do examinations. We presented the practical diagnostic algorithm in microcytosis.*

**Key words:** talasemia, children, diagnosis, molecular diagnosis

*J. Transf. Med. 2011; 3: 105–114*

## Wstęp

Talasemie to grupa genetycznie uwarunkowanych niedokrwistości hemolitycznych, spowodowanych ilościowym zaburzeniem syntezy łańcuchów globiny, zaliczana do grupy hemoglobinopatii ilościowych [1]. Zaburzenie dotyczyć może każdego

z pięciu rodzajów łańcuchów globinowych, najczęściej obejmuje jednak łańcuch  $\alpha$  lub  $\beta$ . Zmniejszona synteza hemoglobiny prowadzi do niedokrwistości, a zmniejszenie stężenia hemoglobiny w erytrocytach warunkuje jej hipochromiczny i mikrocytowy charakter. Zaburzenie proporcji pomiędzy poszczególnymi łańcuchami globiny narusza stabilność ery-

trocytu i warunkuje hemolityczny charakter choroby. Akumulacja niesparowanych łańcuchów globinowych prowadzi do wytrącania się ich w postaci nierozpuszczalnych wtrętów już w prekursorach krwinek czerwonych, wywołując ich wewnątrzszpikowe niszczenie w mechanizmie apoptozy, i w konsekwencji nieefektywną erytropoezę [2, 3]

Talasemia może przebiegać bezobjawowo lub przybierać postać od łagodnej, aż do ciężkiej niedokrwistości hemolitycznej. W przypadku talasemii- $\alpha$ , będącej najcięższą postacią talasemii, całkowity brak łańcuchów  $\alpha$  wiedzie do wewnątrzmacicznego zgonu lub uogólnionego obrzęku płodu [4, 5]. Szacuje się, że 4,83% ogólnej populacji świata jest nosicielem genu jednej z postaci talasemii [3]. Obecnie choroba ta traktowana jest jako globalny problem zdrowotny. Ocenia się, że w ciągu najbliższych 20 lat liczba urodzeń z klinicznie jawną postacią tej choroby sięgnie na świecie 900 000 [6–8].

W ogólnym odczuciu polskich lekarzy talasemia to choroba basenu Morza Śródziemnego, czyli rejonu jej najczęstszego występowania, i w diagnostyce niedokrwistości mikrocytowej w polskich warunkach właściwie nie może być brana pod uwagę. W niniejszym artykule, dzieląc się własnymi doświadczeniami, autorzy postarają się wykazać, że również w Polsce można się z tym schorzeniem spotkać, a diagnostyka, nawet jeśli już takie podejrzenie powstanie, nie jest wcale prosta. Wskażą oni także na możliwości i ograniczenia badań genetycznych.

Celem podjętej pracy była ocena znaczenia i ważności poszczególnych parametrów hematologicznych w rozpoznaniu różnicowym niedokrwistości mikrocytowych u dzieci, określenie roli badań genetycznych w rozpoznawaniu talasemii u dzieci oraz opracowanie optymalnego algorytmu postępowania diagnostycznego przy podejrzeniu talasemii.

## Materiał i metody

Analizie poddano 52 dzieci (31 chłopców i 21 dziewcząt) w wieku 1–15 lat, hospitalizowanych w latach 2000–2007 w Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii WUM z powodu niedokrwistości mikrocytowej, nie poddającej się leczeniu żelazem. Charakterystykę badanej grupy dzieci ilustruje tabela 1.

Poszukując przyczyny niedokrwistości mikrocytowej, w pierwszej kolejności przeprowadzano diagnostykę laboratoryjną obejmującą morfologię krwi obwodowej z rozmazem ręcznym (dr nauk biol. A. Siwicka) i oznaczeniem parametrów czerwono-krwinkowych (MCV, MCH, RDW) — Mentzer, Shine-Lal, England-Frazer oraz retikulocytów; oznaczano także stężenie żelaza i ferrytyny w surowicy

**Tabela 1.** Ogólna charakterystyka badanej grupy dzieci

**Table 1.** Characteristics of the study group

<b>Ogółem</b>	52
Chłopcy	31
Dziewczęta	21
Rodzeństwa	7
Polskie pochodzenie	50
Inne pochodzenie	2
Rodzinne obciążenie talasemią	16
Sferocytoza wrodzona	1

**Tabela 2.** Wskaźniki czerwono-krwinkowe stosowane w diagnostyce różnicowej niedokrwistości mikrocytarnych

**Table 2.** Red blood cell parameters used in the differential diagnosis of microcytic anemias

Wskaźnik	Sposób obliczania	Interpretacja wyników
<b>Mentzer</b>	MCV/RBC	< 13 — talasemia minor > 13 — niedobór żelaza
<b>Shine-Lal</b>	MCV × MCH	< 1530 — talasemia minor > 1530 — niedobór żelaza
<b>England-Frazer</b>	MCV-(Hgb × 5)– –RBC–3,4	< 0 — talasemia minor > 0 — niedobór żelaza

krwi. Wskaźniki czerwono-krwinkowe służące różnicowaniu niedokrwistości mikrocytowych obliczano i oceniano zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 2.

Po zanalizowaniu badań podstawowych u wszystkich chorych, diagnostykę poszerzono o elektroforezę hemoglobinu, oznaczenie poziomu HbA2 i HbF, a dodatkowo w trzech przypadkach o oznaczenie enzymów krwinek czerwonych. U dwóch chorych wykonano badanie w kierunku sferocytozy wrodzonej (test EMA). **Elektroforezę hemoglobinu** wykonano w Zakładzie Biochemii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. **Oznaczenia stężeń HbA2** dokonywano za pomocą chromatografii mikrokolumnowej. **Oznaczeń HbF w hemolizacie** dokonywano w oparciu o zasadę, że w przeciwieństwie do HbA i HbA2, HbF nie ulega denaturacji w środowisku mocnych zasad. Stężenie HbF po wytrąceniu HbA i HbA2 oznaczano spektrofotometrycznie (długość fali 540 nm). **Badanie w kierunku sferocytozy wrodzonej** przeprowadzano z użyciem nowoczesnej metody, jaką jest cytometryczna analiza zaburzeń białek cytoszkieletu i błon erytrocytów (test EMA). **Badanie w kierunku enzymopatii krwinkowych prze-**

**Tabela 3.** Zbiornicze wyniki podstawowych badań hematologicznych w analizowanej grupie dzieci**Table 3.** Routine blood test results in the analyzed group of children

Badany parametr	Zakres/częstość
Hemoglobina	7,0–14,3 g/dl
Eryocyty	2,71–6,28 mln/ul
MCV (średnia objętość krwinki)	51,7–97 fl
MCH (średnie stężenie hemoglobiny)	13,5–34,1 pg
Żelazo	15–205 µg/dl (3 × < normy = 37 µg/dl)
Ferrytyna	2,05–500,75 µg/l (2 × < normy = 7 µg/l)
Trzy wskaźniki dodatnie	25/52
Dwa wskaźniki dodatnie	8/52 (7 × Mentzer i Shine-Lal; 1 × Mentzer i England-Fraser)
Jeden wskaźnik dodatni	7/52 (6 × Shine-Lal; 1 × England-Fraser)
Żaden dodatni	12/52

prowadzono metodą spektrofotometryczną, oznaczając aktywność enzymów krwinek czerwonych: dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej, heksokinazy, izomerazy glukozo-fosforanowej, kinazy pirogrogonianowej, według metod Buetlera i wsp. [9]. **Badania genetyczne** obejmowały sekwencjonowanie genu  $\beta$ -globiny i wykrywanie delecji genów  $\alpha$ -globiny. **DNA chorego izolowano** z krwi pobieranej do próbek zawierających EDTA, przy wykorzystaniu zestawu DNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow/Tissue (Roche, Niemcy). Tak uzyskane DNA wykorzystywano do łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*).

**Sekwencjonowanie genu  $\beta$ -globiny:** do amplifikacji genu kodującego  $\beta$ -globinę wraz z otaczającymi fragmentami 5'UTR i 3'UTR wykorzystano. Produkty PCR analizowano metodą elektroforezy agarozowej, następnie oczyszczano na kolumnach QIAquick (Qiagen, Germany). Produkty PCR zawierające fragmenty genu zsekwencjonowano na aparacie ABI Prism 377 (Applied Biosystem, Stany Zjednoczone). **Do wykrywania delecji genów  $\alpha$ -globiny** także wykorzystano PCR. Produkty PCR analizowano metodą elektroforezy agarozowej na 2-procentowym żelu.

Wykonanie badań genetycznych poprzedzone było oddzielną, dobrowolną zgodą pacjenta lub jego rodziców/opiekunów, uzyskaną po pisemnej i ustnej informacji o zakresie, metodzie i znaczeniu badań. Zgoda ta mogła być cofnięta przez chorego lub jego rodziców/opiekunów na każdym etapie badania.

Praca uzyskała akceptację Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej WUM — Nr zgody 65/2007.

## Wyniki

Wyniki podstawowych badań hematologicznych w badanej 52-osobowej grupie dzieci zestawiono w tabeli 3.

W rozmazie krwi obwodowej u 43/52 dzieci występowała anizocytoza, poikilocytoza oraz obecne były liczne krwinki tarczowate, w pozostałych 9/52 przypadkach występowały: poikilocytoza, anizocytoza, eryocyty miernie wypełnione hemoglobina, jednak bez obecności krwinek tarczowatych.

Elektroforeza hemoglobin była prawidłowa w 39/52 przypadkach, w 1/52 wskazywała na talasemię pośrednią, w 1/52 wykazała obecność dodatkowego prążka między Hb S i C, w 7/52 stwierdzono podwyższony poziom HgbF, w 2/52 podwyższony poziom HgbA2, w 2/52 podwyższony poziom HgbA2 i HgbF.

U 28/52 pacjentów w związku z podwyższonym stężeniem HgbA2 i HgbF oraz wynikami elektroforetycznego rozkładu hemoglobin udało się rozpoznać talasemię- $\beta$  minor. U pozostałych 24/52 chorych na tym etapie diagnostyki nie udało się ustalić rozpoznania talasemii, pomimo nieprawidłowości w elektroforetycznym rozkładzie hemoglobin, izolowanego podwyższonego stężenia HgbF (9 przypadków) i charakterystycznej dla talasemii morfologii układu czerwonekrwinkowego. W tej sytuacji, aby uzyskać ostateczne rozpoznanie konieczne było zastosowanie nowoczesnych molekularnych metod diagnostycznych, wykrywających mutacje w genie  $\alpha$ - i  $\beta$ -globiny. W związku z tym dzieci podzielono na dwie grupy w zależności od możliwości ustalenia rozpoznania talasemii po przeprowadzeniu standardowych badań.



**Tabela 4.** Wyniki badań genetycznych**Table 4.** The results of genetic tests

Wynik badania genetycznego
IVS-I-6(T > C)
5'UTR+33(C > T)
Codon 98 GTG > ATG Hb Köln
IVS-I-6 (SfaNI)
5'UTR+33(C > T) i IVS-II-745(C > G)
IVS-I-5 (G > A) nowa mutacja
Del 42
5'UTR+33(C > T) i IVS-I-15(T > C)
5'UTR+33(C > T) i IVS-I-15(T > C)

**Grupa pierwsza** obejmowała 28 dzieci z rozpoznaną już talasemią- $\beta$  minor. U tych dzieci zabezpieczono materiał do badań genetycznych w celu określenia charakterystycznych dla polskiej populacji mutacji w obrębie genu  $\beta$ -globiny. Dodatnie wyniki analizy uzyskano w 10 przypadkach (w 9 były to mutacje punktowe, w 1 delecja). W pozostałych przypadkach analiza zakończyła się niepowodzeniem. Wyniki zebrano w tabeli 4.

**Do grupy drugiej** włączono 24 dzieci z podejrzeniem talasemii, u których standardowe metody diagnostyczne nie pozwoliły na ustalenie rozpoznania. W celu ustalenia ostatecznego rozpoznania przeprowadzono badania genetyczne.

Wyniki badań genetycznych potwierdziły talasemię- $\alpha$  jako przyczynę niedokrwistości mikrocytowej u 6 dzieci, u których bez badania genetycznego postawienie ostatecznej diagnozy nie byłoby możliwe. W tej grupie, w 4 przypadkach wykryto delecję jednego łańcucha  $\alpha$ -globiny (genotyp  $-\alpha/\alpha$ ), w pozostałych 2 delecji uległy dwa łańcuchy  $\alpha$ -globiny (genotyp  $-\alpha/-\alpha$ ).

Badanie genetyczne pozwoliło również na ustalenie rozpoznania talasemii- $\beta$  minor u chłopca, u którego poziom Hgb wyniósł 14,3 g/dl, liczba erytrocytów mieściła się w górnej granicy normy (5,45 mln/ $\mu$ l), a MCV 78,6 fl i MCH 26,2 pg, przy jednocześnie negatywnym wyniku elektroforezy hemoglobin w kierunku talasemii. Wykonane w klinice oznaczenia stężenia żelaza i ferrytyny w surowicy krwi były prawidłowe, a stężenie żelaza wynosiło 140  $\mu$ g/dl i mieściło się w górnej granicy normy (37–180  $\mu$ g/dl). Dopiero wynik badania genetycznego wykazujący mutację punktową w regionie niekodującym 3' UTR 1 pod postacią substytucji, pozwolił na ostateczne rozpoznanie u niego talasemii- $\beta$  minor.

U 9/24 dzieci z grupy 2., w tym dwóch rodzeństw i jednego chłopca ze sferocytozą wrodzoną, na podstawie wyników badań podstawowych (morfologia krwi z rozmazem ręcznym), dodatkowych (oznaczenie stężenia żelaza i ferrytyny w surowicy krwi) oraz podwyższenia poziomu HgbF podejrzewano występowanie dość rzadkiej postaci talasemii  $\delta\beta$ , w której poziom HgbF wynosi 5–15%, lub współwystępowanie talasemii- $\beta$  ze sferocytozą wrodzoną. Negatywne wyniki badań genetycznych nie pozwoliły jednak na rozpoznanie u nich żadnej z postaci talasemii. U trojga wynik badania genetycznego był prawidłowy. W pozostałych 6 przypadkach (2 rodzeństwa, chłopiec z rodzinnym obciążeniem talasemią i dziewczynka z poziomem HgbF 4,7%) w badaniu genetycznym nie wykryto mutacji w obrębie genów  $\alpha$ - i  $\beta$ -globiny, natomiast rozpoznano mutację promotora genu  $\gamma$ -globiny (Xmn1(C > T)). Mutacja ta związana jest z podwyższeniem stężenia HgbF.

U 7 dzieci z grupy 2., pomimo charakterystycznej dla talasemii morfologii krwinek czerwonych, a w przypadku jednego rodzeństwa dodatniego wywiadu rodzinnego, badanie genetyczne nie wykazało nieprawidłowości w obrębie DNA genu  $\alpha$ - i  $\beta$ -globiny. W jednym przypadku badanie genetyczne wykazało polimorfizm promotora genu  $\gamma$ -globiny (Xmn1).

Podsumowując wyniki badań genetycznych u dzieci w grupie 2., można stwierdzić, że u 7 z nich badanie genetyczne pozwoliło na rozpoznanie jednej z postaci talasemii, jednak aż u 17 dzieci z tej grupy badanie genetyczne nie dostarczyło podstaw do rozpoznania talasemii. U 7 z nich wykryto polimorfizm promotora genu  $\gamma$ -globiny bez mutacji w obrębie genów dla  $\alpha$ - i  $\beta$ -globiny, a u 10 dzieci badania genetyczne nie wykazały żadnych nieprawidłowości.

## Dyskusja

Niniejsza praca, w której wykorzystano niektóre dane z wcześniejszych publikacji własnych [4, 5], jako jedna z niewielu w rodzimym piśmiennictwie, zwraca uwagę na problem występowania talasemii w populacji dzieci polskich. Dzięki większej dostępności i udoskonaleniu metod diagnostycznych okazało się, że talasemia występuje w Polsce znacznie częściej, niż myślano do tej pory. Zastosowanie elektroforezy hemoglobin, możliwości oznaczania stężenia HgbA2 i HgbF oraz wprowadzenie badań genetycznych pozwoliło na ustalenie ostatecznego rozpoznania talasemii w coraz większym odsetku przypadków niedokrwistości mikrocytowej, długo-

trwale i bezskutecznie leczonej preparatami żelaza. Uzyskane wyniki wykazały, że w populacji dzieci polskich głównie można się spotykać z łagodnymi postaciami talasemii (talasemia- $\beta$  minor, talasemia- $\alpha$  minor) bądź bezobjawowym nosicielstwem talasemii- $\alpha$ . W materiale własnym i piśmiennictwie polskim nie opisywano jak dotąd przypadków talasemii  $\alpha$  i  $\beta$  major, co wskutek coraz większej migracji ludności może jednak w przyszłości ulec zmianie. Należy jeszcze raz podkreślić, że wszystkie dzieci z talasemią badane przez autorów, przed przyjęciem do kliniki były długotrwanie i bezskutecznie leczone preparatami żelaza z powodu niedokrwistości mikrocytovej. Obserwacja ta jest zgodna z licznymi danymi z piśmiennictwa i powinna skłonić lekarza praktyka do rozważenia talasemii jako istotnej przyczyny niedokrwistości mikrocytovej, szczególnie w tych przypadkach, gdy terapia żelazem nie przynosi spodziewanych efektów [2, 5, 10, 11].

Podstawą do badań w kierunku talasemii jest, poza nieskutecznością terapii żelazem, obecność w morfologii krwi obwodowej erytrocytozy, mikrocytozy i obniżonego MCH, przy prawidłowych parametrach gospodarki żelazem. Zmiany te znalazły potwierdzenie w przedstawionym materiale klinicznym, z wyjątkiem dwojga dzieci z niedoborem żelaza i towarzyszącym mu obniżeniem stężenia ferrytyny w surowicy krwi, u których jednak obserwowano charakterystyczne dla talasemii parametry układu czerwonekrwinkowego [1, 12–15]. Przynależność w piśmiennictwie charakterystyczny dla talasemii obraz rozmazu krwi obwodowej, z obecnością poikilocytozy, anizocytozy i krwinek tarczowatych, został zaobserwowany także w grupie 28 chorych z talasemią- $\beta$  minor (grupa 1) oraz w grupie 2., u 6 dzieci z talasemią- $\alpha$  minor i u 8 dzieci z tej grupy, u których badanie genetyczne nie potwierdziło ostatecznie rozpoznania talasemii [1, 10, 11, 16, 17]. U pozostałych dzieci w rozmazach krwi obwodowej obserwowano anizocytozę i poikilocytozę, co także jest zgodne z piśmiennictwem [1, 6, 10].

Mimo że podkreśla się obecność mikrocytozy (MCV < 75 fl) u dzieci z talasemią [1, 10, 13, 14], co znalazło potwierdzenie także w badaniach autorów, to jednak talasemia przebiegać może także bez tego objawu, czego przykładem jest dwoje chorych z przebadanej grupy 1., u których talasemią- $\beta$  minor potwierdzono pomimo nietypowego MCV (> 90 fl), nieobecności erytrocytozy oraz MCH > 25 pg.

Zgodnie z piśmiennictwem [1, 5, 10, 12] prawidłowa gospodarka żelazem (żelazo i ferrytyna) przy erytrocytozie i mikrocytozie powinna skłonić lekarza do podjęcia diagnostyki w kierunku talasemii. Tak też i było u wszystkich chorych z grupy

1 (talasemia- $\beta$  minor), z wyjątkiem jednej dziewczynki, u której poziom żelaza był obniżony przy prawidłowym poziomie ferrytyny.

W grupie 2. u 5/6 dzieci z rozpoznaną talasemią- $\alpha$  minor, stężenia żelaza i ferrytyny były w normie, natomiast u jednego chłopca obserwowano znaczny stopień zaburzenia gospodarki żelazowej (Fe — 15  $\mu$ g/dl, ferrytyna — 2,05 ng/l). Obserwacja ta jest zgodna z danymi z piśmiennictwa [18, 19], które wskazują na możliwość współistnienia talasemii z niedoborem żelaza i niekiedy koniecznością suplementacji żelazem w przypadku talasemii. W pozostałych 17 przypadkach nie obserwowano odchyień od normy w zakresie stężenia żelaza i ferrytyny, natomiast u jednego chłopca obserwowano nieznaczny stopień niedobór żelaza i ferrytyny (Fe 34  $\mu$ g/dl, ferrytyna 4,8 ng/l).

W piśmiennictwie podkreśla się znaczenie wskaźnika RDW (rozrzut wartości wielkości krwinki czerwonej) w diagnostyce różnicowej niedokrwistości mikrocytovej. Wielu autorów jest zdania, że parametr ten jest najbardziej pewnym wskaźnikiem odróżniającym nosicielstwo talasemii od niedokrwistości z niedoboru żelaza, jako przyczyny mikrocytozy [19, 20]. Jego czułość, według Marti i wsp. [21], wynosi 79%, a swoistość 95%. Znaczne podwyższenie RDW stwierdza się w niedokrwistości sideropenicznej, natomiast w przypadku nosicielstwa talasemii wartości RDW utrzymują się w granicach normy lub są nieznacznie podwyższone. W grupie 1. wskaźnik RDW był nieznacznie podwyższony u 17/28 chorych, a u 11/28 chorych pozostawał w granicach normy, co potwierdza cytowane dane z piśmiennictwa. W grupie 2. wskaźnik RDW u 8/24 chorych był w granicach normy, a u 16/24 chorych był nieznacznie podwyższony. Nasze wyniki dowodzą, że ocena RDW ma jedynie znaczenie orientacyjne.

Innym wskaźnikiem pomocnym w różnicowaniu nosicielstwa talasemii od niedokrwistości z niedoboru żelaza u pacjentów z mikrocytozą są opracowane na podstawie podstawowych parametrów czerwonekrwinkowych wskaźniki matematyczne (Mentzer, Shine-Lal, England-Fraser) [22–24]. Żaden z nich stosowany pojedynczo nie jest jednak satysfakcjonujący, gdyż obserwuje się wiele wyników fałszywie dodatnich lub ujemnych. Dlatego też obecnie zaleca się kompleksową ich ocenę w połączeniu ze wskaźnikiem RDW.

Cytowane dane znalazły swoje potwierdzenie także w badaniach prowadzonych przez autorów. W grupie 1. (rozpoznanie talasemii- $\beta$  minor) tylko u 14/28 dzieci wszystkie wskaźniki czerwonekrwinkowe wskazywały na talasemię minor. U 6/28 pacjentów tylko dwa wskaźniki dały pozytywny wy-

nik, u 4 chorych tylko 1 wskaźnik wskazywał na talasemię minor, a u 4/28 dzieci żaden ze wskaźników nie sugerował rozpoznania talasemii minor. W grupie 2. jedynie u 9/24 chorych wszystkie wskaźniki matematyczne wskazywały na talasemię minor, u 12/24 chorych żaden z nich, u dwojga jedynie wskaźnik Shine-Lal i Mentzer, a u jednego tylko wskaźnik England-Fraser.

Dane te ukazały, że w diagnostyce różnicowej niedokrwistości mikrocytowej bardziej przydatne, niż wskaźnik RDW i wskaźniki matematyczne, są: wywiad, podstawowe badania laboratoryjne oraz oznaczenie parametrów gospodarki żelazowej, poszerzone w późniejszym etapie diagnostyki o oznaczanie stężeń HgbA2 i HgbF oraz elektroforezę hemoglobin. W grupie 1. (rozpoznanie talasemii- $\beta$  minor) w 23/28 przypadków elektroforetyczny rozkład hemoglobin był prawidłowy, w jednym przypadku wykazał talasemię pośrednią. W dwóch przypadkach elektroforeza wykazała wzrost poziomu HgbA2 i HgbF zgodny z oznaczeniem stężenia HgbA2 i HgbF, w jednym tylko wzrost poziomu HgbA2. W jednym przypadku elektroforeza hemoglobin wykazała obecność w warunkach alkalicznych i kwaśnych dodatkowego prążka między HgbS i C. Wynik ten wraz ze wzrostem stężenia HgbA2 i późniejszym badaniem genetycznym potwierdziły rozpoznanie talasemii- $\beta$  minor [25, 26].

Choć elektroforetyczny rozkład hemoglobin przybliżył do rozpoznania talasemii, to jednak należy pamiętać, że badanie samo w sobie nie zawsze jest wystarczające do rozpoznania talasemii- $\beta$  minor — autorzy wykazali to na podstawie przebadanej grupy dzieci oraz w swoich wcześniejszych publikacjach [4, 5]. W grupie 2. u wszystkich chorych z rozpoznaniem talasemii- $\alpha$ , elektroforetyczny rozkład hemoglobin nie wykazał odchylenia od normy. Tym samym, nie elektroforetyczny rozkład hemoglobin, a badanie genetyczne jest kluczowym czynnikiem umożliwiającym rozpoznanie tej postaci talasemii. Zostało to potwierdzone, gdy u chłopca przy prawidłowej elektroforezie i prawidłowych stężeniach HgbA2 i HgbF, dopiero dzięki badaniu genetycznemu udało się rozpoznać talasemię- $\beta$  minor. Na znaczenie badań genetycznych w trudnych przypadkach diagnostycznych, dotyczących między innymi talasemii- $\beta$ , zwrócił uwagę Trent [27].

W analizowanej grupie chorych (grupa 2) poddanych badaniom genetycznym w kierunku talasemii, u 6/9 dzieci wykryto mutację promotora genu  $G\gamma$ -globiny (Xmn1(C > T)), a u jednego mutację Xmn1, bez towarzyszącego jej podwyższenia stężenia HgbF i przy prawidłowej elektroforezie. Mutacja ta związana jest z podwyższeniem stężenia

HgbF. Podjednostki  $\gamma$ -globiny kodowane są przez dwa geny zlokalizowane na chromosomach 11, na tych samych, na których znajdują się geny  $\beta$ -globiny. U zdrowych dorosłych synteza HgbF utrzymuje się na niskim poziomie (do 1%). W przypadku talasemii- $\beta$  występuje podwyższenie jej stężenia, co znalazło zastosowanie w diagnostyce.

Warto jednak pamiętać, że u niektórych osób, wskutek genetycznych uwarunkowań, synteza HgbF utrzymuje się przez całe życie na poziomie podobnym do obserwowanego w życiu płodowym, powodując chorobę zwaną chorobą przetrwałej hemoglobiny płodowej. Do wzrostu syntezy HgbF przyczyniają się także niektóre duże delecje i mutacje punktowe w, i poza, obrębem genu  $\beta$ -globiny, a także niekiedy brak mutacji w obrębie genu  $\beta$ -globiny przy tak zwanym „stresie hematopoetycznym”. Poza tym wpływ na zwiększenie syntezy HgbF ma wiele czynników środowiskowych i leków, takich jak: hydroksykarbamid, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, kwas masłowy i erytropoetyna [28–30].

Zmienność objawów klinicznych u chorych dotkniętych talasemią wynika z różnego stopnia upośledzenia syntezy łańcuchów globinowych oraz współwystępowania wrodzonych czynników modyfikujących przebieg i ciężkość choroby. Zalicza się do nich współwystępowanie talasemii  $\alpha$  i  $\beta$ , a także zwiększenie produkcji hemoglobiny płodowej u osób z talasemią- $\beta$ , dzięki której dysproporcja pomiędzy niesparowanymi łańcuchami globiny zmniejsza się, prowadząc do redukcji wytrącania agregatów niesparowanych łańcuchów, a w efekcie do zwiększenia skuteczności erytropoezy i wydłużenia czasu przeżycia erytrocytów w krążeniu [2, 3, 10].

Opisywane w piśmiennictwie współwystępowanie talasemii- $\beta$  major i intermedia oraz anemii sierpowatokrwinkowej z polimorfizmem promotora genu  $G\gamma$ -globiny (Xmn1(C > T)) skutkuje łagodniejszym przebiegiem choroby i często wiąże się z brakiem konieczności transfuzji krwi [31–34].

Przeprowadzone przez autorów badania genetyczne potwierdziły znaną z piśmiennictwa [18–20] tezę, że mutacja Xmn1 (C > T) skutkuje podwyższeniem stężenia HgbF. Mutacja ta spotykana jest także u ludzi zdrowych, bez towarzyszących mutacji w obrębie genu  $\beta$ -globiny. Uzyskane dotychczas wyniki badań genetycznych u pacjentów z rozpoznaniem talasemii- $\beta$  minor, poza jednym przypadkiem, w którym nie obserwowano podwyższenia stężeń HgbA2 i HgbF, choć nie miały kluczowego znaczenia w rozpoznawaniu tej postaci talasemii, są jednak bardzo istotne ze względu na możliwość stworzenia bazy danych o najczęstszych mutacjach



w obrębie genu  $\beta$ -globiny w naszej populacji. Ma to tym większe znaczenie, że jedynie 4 spośród wykrytych w opisywanym w pracy badaniu mutacji (Hgb Köln, 5'UTR+33(C > T), IVS-2-745(C > G), IVS-1-6(T > > C)) znajdują się w międzynarodowej bazie mutacji dostępnej na stronie internetowej <http://globin.cse.psu.edu>. Pozostałe, wykryte u chorych mutacje (IVS-1-5(G > A), 3' UTR 1 substytucja, IVS-1-15(T > C) i Del 42) nie figurują w rejestrze i jest wielce prawdopodobne, że mogą być one charakterystyczne dla populacji polskiej. Ta ciekawa hipoteza wymaga jednak potwierdzenia w większej liczbie chorych z talasemią- $\beta$  minor.

Występowanie mutacji IVS-1-6 (T > C), obejmującej intron 1 genu  $\beta$ -globiny, w której w pozycji 6 nastąpiła zamiana zasad (T > C), u heterozygot objawia się klinicznie mikrocytozą (MCV 64,7–77,3 fl), hipochromią (20,6–24 pg) i niewielkiego stopnia niedokrwistością (Hgb 9,55–14,35 g/dl). Stężenia HgbA2 oscylują w granicach 3,35–4,45%, a HgbF w granicach 0,1–2,2%.

U pacjentów będących homozygotami mutacja ta jest odpowiedzialna za wystąpienie talasemii pośredniej, tak jak to miało miejsce w odniesieniu do jednego z badanych przez autorów pracy pacjentów. Z największą częstością mutacja ta występuje w zachodniej części Basenu Morza Śródziemnego [17, 22], i jak dotychczas, brak jest pełnych danych na temat częstości jej występowania w populacji polskiej.

Kolejna wykryta w tej grupie mutacja punktowa uważana była dotychczas za charakterystyczną dla Tatarów. Dotyczy ona regionu niekodującego 5'UTR+33(C > T), skojarzonego z mutacją w obrębie intronu 1, w którym to w pozycji 15 nastąpiła zamiana (T > C). Wymieniona mutacja w obrębie intronu nie była dostępna w międzynarodowej bazie mutacji obejmujących gen  $\beta$ -globiny [17, 22]. Jest więc to następna mutacja, dotychczas nie stwierdzona w populacji polskiej.

Do grona stwierdzonych przez autorów nowych mutacji należy też mutacja obejmująca intron 1 (IVS-1-5(G > A)), w którym w pozycji 5 zamianie uległa G > A. Warto podkreślić, że ta nowa mutacja nie jest dotychczas skatalogowana w międzynarodowym rejestrze.

Kolejną znaną mutacją w tej grupie chorych, zlokalizowaną w egzonie, jest mutacja punktowa w kodonie 98 pod postacią zamiany waliny na metioninę (GTG > ATG), znana pod postacią Hgb Köln. Hgb Köln należy do grupy hemoglobin niestabilnych i opisana została po raz pierwszy w Europie w 1965 roku przez Piribilla [35]. Mutacja ta u heterozygot powoduje łagodną niedokrwistość hemolityczną, a spotkać ją można w wielu populacjach

i u wielu ras. W piśmiennictwie opisywane są także częste mutacje *de novo* [17, 21, 27]. Taka też sytuacja miała miejsce u chorego badanego przez autorów.

Następna wykryta w tej grupie mutacja IVS-2-745 (C > G) opisana jest w międzynarodowej bazie mutacji genu  $\beta$ -globiny. Jest ona charakterystyczna dla chorych pochodzących z regionów Basenu Morza Śródziemnego [17, 22]. U pacjentów będących heterozygotami odpowiada ona za umiarkowaną niedokrwistość (Hgb 9,95–13,05 g/dl), mikrocytozę (64,9–76,5 fl) i hipochromię (19,1–21,7 pg), ze stężeniami HgbA2 i HgbF odpowiednio 4,45–5,6% i 0,4–2,2%. U homozygot rozwija się ciężka postać talasemii- $\beta$ . U pacjenta przebadanego przez autorów mutacja ta skojarzona była z mutacją 5'UTR+33 (C > T). Co ciekawe, parametry takie jak: Hgb, MCH, stężenia HgbA2 i HgbF mieściły się w granicach charakterystycznych dla heterozygot, a jedynie MCV nie mieściło się w wyżej wymienionych granicach.

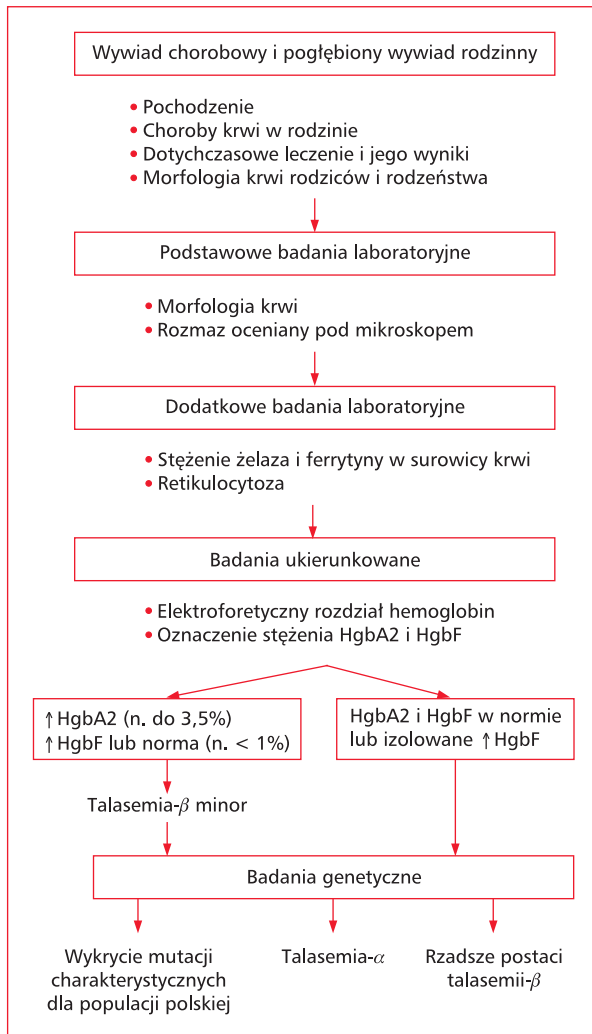
Podsumowując wyniki badań genetycznych przeprowadzonych w badanej grupie 24 dzieci, autorzy zauważają, że u 7 (29,1%) badanie genetyczne pozwoliło na rozpoznanie jednej z postaci talasemii. U 7 dzieci (29,1%) wykryto polimorfizm promotora genu  $\gamma$ -globiny bez mutacji w obrębie genów dla  $\alpha$ -i  $\beta$ -globiny, u 10 dzieci (41,6%) badania genetyczne nie wykazały żadnych nieprawidłowości. Choć liczby te nie są zbyt wielkie, to w ślad za Hendricks'em [11], autorzy podkreślają, że postawienie ostatecznego rozpoznania talasemii- $\alpha$  minor u 6 badanych dzieci z grupy 2. możliwe było jedynie dzięki badaniom genetycznym. Stwierdzone rodzaje mutacji (delecja 3,7 kb i 4,2 kb) są najczęstsze i występują w różnych grupach etnicznych i populacjach [17, 22].

## Podsumowanie

Przedstawione wyniki wskazują, że z uwagi na dużą liczbę fałszywie dodatnich i ujemnych wyników, wskaźniki matematyczne zalecane jako wstępne badanie przesiewowe u chorych z mikrocytozą nie wydają się mieć wielkiego znaczenia, szczególnie przy dostępności innych metod diagnostycznych, takich jak elektroforetyczny rozkład hemoglobiny i oznaczenie stężeń HgbA2 i HgbF.

Wyniki badań genetycznych u dzieci z talasemią pokazują nie tylko ich rolę w diagnostyce niedokrwistości mikrocytowych, lecz także są niezwykle interesujące ze względu na różnorodność mutacji wykrytych u tych chorych. Stwarzają one podwaliny pod dalsze, zakrojone na znacznie szerszą skalę, badania zmian genetycznych występujących w populacji polskich pacjentów chorych na talasemię.





**Rycina 1.** Algorytm postępowania diagnostycznego przy podejrzeniu talasemii

**Figure 1.** Schematic algorithm of the diagnostic approach to suspected thalassemia

Warto także podkreślić, że badania genetyczne, pomimo oczekiwań, nie zawsze są w stanie udzielić ostatecznej odpowiedzi, przynajmniej na obecnym etapie ich zaawansowania.

Autorzy zwracają także uwagę, że wystąpienie u chorego takich zmian, jak: erytrocytoza, mikrocytoza, obniżenie MCH przy prawidłowych parametrach gospodarki żelazem, czy też obecność w rozmazie krwi obwodowej krwinek tarczowatych, powinno być wskazaniem do skierowania pacjenta do diagnostyki w kierunku talasemii- $\alpha$ , rzadszych postaci talasemii- $\beta$  lub ich współwystępowania.

Na podstawie uzyskanych i przedstawionych wyników i doświadczeń autorzy stworzyli dostosowany do naszych krajowych możliwości, także finan-

sowych, algorytm postępowania diagnostycznego, przeznaczony dla pacjentów z niedokrwistością mikrocytową, który przedstawiono na rycinie 1.

## Piśmiennictwo

1. Benz E.J., Giardina P. Thalassemia syndromes. W: Miller D.R., Bachner R.L. (red.). Blood Diseases of Infancy and Childhood. Mosby-Year Book, St. Louis 1995: 460–498.
2. Rachmilewitz E., Schrier S.L. Pathophysiology of  $\beta$ -thalassemia. W: Steinberg M.H., Forget B.G., Higgs D.R., Nagel R.L. (red.). Disorders of hemoglobin. Cambridge University Press 2001: 233–251.
3. Urbinati F., Madigan C., Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2006; 8 (10): 1–26.
4. Albrecht-Stanisławska K., Adamowicz-Salach A., Zdebska E., Matysiak M. Talasemie — dotąd mało znana przyczyna niedokrwistości u dzieci w Polsce. *Ped. Pol.* 2006; 81 (11): 828–833.
5. Albrecht-Stanisławska K., Adamowicz-Salach A., Matysiak M. Talasemie diagnostyka i leczenie. *Klin. Ped.* 2005; 13 (3): 333–334.
6. Vichinsky E.P. Changing patterns of thalassemia worldwide. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2005; 1054: 18–24.
7. Weatherall D.J., Clegg J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull. World Health Organ* 2001; 79: 704–712.
8. Angastiniotis M., Modell B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998; 850: 251–269.
9. Beutler E. (red.). Cell metabolism: a manual of biochemical methods. 3rd edition. New York, Grune and Stratton 1984: 6871.
10. Takeshita K. Thalassemia Beta. *Emedicine*, August 4, 2005; 1–11.
11. Hendricks L.K. Thalassemia alpha. *Emedicine*; August 11, 2003; 1–11.
12. Rund D., Rachmilewitz E. Beta Thalassemia. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353 (11): 1135–1146.
13. Mojtahedzadek F., Kosaryan M., Mahdari M.R., Akbari J. The effect of folic acid supplementation in beta-thalassemia major: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Arch. Iran. Med.* 2006; 9 (3): 266–268.
14. The Thalassemia Working Party of the BCSH General Haematology Task Force. Guidelines for investigation of the  $\alpha$  and  $\beta$  thalassemia trait. *J. Clin. Pathol.* 1994; 47: 289–292.
15. Hegde U.M., White J.M., Hart G.H., Marsh G.W. Diagnosis of alpha-thalassemia trait from Coulter Counter 'S' indices. *J. Clin. Pathol.* 1977; 30: 884–889.
16. Nathan D.G., Gunn R.B. Thalassemia: the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis. *Am. J. Med.* 1966; 41: 815–830.
17. The General Haematology Task of the British Committee for Standards in Haematology Guidelines. The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies. *Br. J. Haematol.* 1998; 101: 783–792.
18. Harthoorn-Lasthuizen E.J., Lindemans J., Langenhuijsen M.M. Influence of iron deficiency anaemia on haemoglobin A2 levels. Possible consequences for beta-thalassaemia screening. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1995; 59 (1): 65–70.
19. Ghionni A., Miotti T.C., Camandona U. Differential erythrocyte parameters in thalassemia minor and hyposideremic syndromes. *Minerva Med.* 1985; 76: 1143–1148.

20. Demir A., Yarali N., Fisgin T., Duru F., Kara A. Most reliable indices in differentiation between thalassemia trait and iron deficiency anemia. *Pediatr. Int.* 2002; 44: 612–616.
21. Marti H.R., Fischer S., Killer D., Burgi W. Can automated haematology analyzer discriminate thalassaemia from iron deficiency? *Acta Haematol.* 1987; 78: 180–183.
22. Mentzer W.C.Jr. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1973; 1: 882.
23. Shine I., Lal S. A strategy to detect beta-thalassaemia minor. *Lancet* 1977; 1: 692–694.
24. England J.Vi, Fraser P.M. Differentiation of iron deficiency from thalassemia trait by routine blood count. *Lancet* 1973; 1: 449–452.
25. Huisman T.H.J., Carter M.F.H., Efremov G.D. A syllabus of Human Hemoglobin Variants (1996). The Sickle Cell Anemia Foundation, August, GA, USA.
26. Hardison R., Chui D.H.K., Riemer C. i wsp. Acces to “Syllabus of Human Hemoglobin Variants (1996)” via the World Wide Web. *Hemoglobin* 22: 113–127 PubMed.
27. Trent R.J. Diagnosis of the haemoglobinopathies. *Clin. Biochem. Rev.* 2006; 27 (1): 27–38.
28. Forget B.G. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad. Sci.* 1998; 850: 38–44.
29. Garner C., Tatu T., Reittie J.E. i wsp. Genetic influences of F cells and other hematologic variables: A twin heritable study. *Blood* 2000; 95: 342–346.
30. Leonova J.Y., Kazanetz E.G., Smetanina N.S., Adekile A.D., Efremov G.D., Huisman T.H.J. Variability in the fetal hemoglobin level of the normal adult. *Am. J. Hematol.* 1996; 53: 59–65.
31. El Agouza I., Abu Shahla A., Sirdah M. The effect of iron deficiency on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin. Lab. Haematol.* 2002; 24 (5): 285–289.
32. Bandyopadhyay S., Mondal B.C., Sarkar P., Chandra S., Das M.K., Dasgupta U.B. Two  $\beta$ -globin cluster-linked polymorphic loci in thalassemia patients of variable levels of fetal hemoglobin. *Eur. J. Haematol.* 2005; 75: 47–53.
33. Nadkarni A., Sakaguchi T., Gorakshakar A. i wsp. An interplay of alleviating mutations in the clinical phenotype of thalassaemia intermedia. *Clin. Lab. Haem.* 2004; 26: 419–422.
34. Nagel R.L. Disorders of Hemoglobin Function and Stability. Steinberg M.H., Forget B.G., Higgs D.R., Nagel R.L. Disorders of hemoglobin. Cambridge University Press 2001: 1155–1194.
35. Pribilla W., Klesse P., Betkle K. Hämoglobin Köln-Krankheit, Familiäre hypochrome hämolytische anämie mit hämoglobina-nomalie. *Klin. Wochenschr.* 1965; 43: 1049–1053.